

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/86, A61K 48/00	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/10087 (43) Date de publication internationale: 4 avril 1996 (04.04.96)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01227</p> <p>(22) Date de dépôt international: 22 septembre 1995 (22.09.95)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 94/11510 27 septembre 1994 (27.09.94) FR</p> <p>(71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cédex 13 (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): TOCQUE, Bruno [FR/FR]; 58, boulevard de la Libération, F-92400 Courbevoie (FR). WASYLIK, Bohdan [FR/FR]; 2, rue du Romarin, F-67400 Illkirch (FR).</p> <p>(74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARIPO (KE, MW, SD, SZ, UG).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i></p>
<p>(54) Title: METHOD FOR TREATMENT OF CANCERS BY REGULATING THE ACTIVITY OF RAS PROTEINS</p> <p>(54) Titre: METHODE DE TRAITEMENT DES CANCERS PAR REGULATION DE L'ACTIVITE DES PROTEINES RAS</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The present invention relates to a method for the treatment of cancers by regulation of the activity of ras proteins. More particularly, it relates to a method for treating cancers by means of a compound capable of antagonizing the activity of ETS proteins.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>La présente invention concerne une méthode de traitement des cancers par régulation de l'activité des protéines ras. Plus particulièrement, elle concerne une méthode de traitement des cancers au moyen d'un composé capable d'antagoniser l'activité des protéines ETS.</p>		

BEST AVAILABLE COPY

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brazil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

METHODE DE TRAITEMENT DES CANCERS PAR
REGULATION DE L'ACTIVITE DES PROTEINES RAS

La présente invention concerne une nouvelle méthode pour le traitement des cancers. Plus particulièrement, elle concerne une méthode de traitement des cancers par régulation de l'activité des protéines ras. Elle concerne également des vecteurs de thérapie génique permettant de réguler l'activité de la protéine ras, ainsi que les compositions pharmaceutiques les contenant.

Les produits des gènes ras, généralement désignés protéines p21, jouent un rôle clé dans le contrôle de la division cellulaire chez tous les organismes eucaryotes où ils ont été recherchés. Certaines modifications spécifiques de ces protéines leur font perdre leur contrôle normal et les conduisent à devenir oncogéniques. Ainsi, un grand nombre de tumeurs humaines ont été associées à la présence de gènes ras modifiés. De même, une surexpression de ces protéines p21 peut conduire à un dérèglement de la prolifération cellulaire. L'élucidation des différentes fonctions biologiques de ces protéines p21 dans les cellules, de leur mode de fonctionnement et de leurs caractéristiques est par conséquent d'un intérêt majeur pour la compréhension et l'approche thérapeutique de la cancérogénèse.

Le gène ras est un élément clé d'une voie de signalisation très conservée de la levure à l'espèce humaine, reliant l'extérieur de la cellule à des effecteurs de la croissance et de la différenciation cellulaires. Cette voie de signalisation met en jeu un certain nombre de composants identifiés, et en particulier des récepteurs tyrosine kinase, des protéines de liaison intermédiaire (GRF, SOS, etc), les protéines ras, puis une cascade de kinases comprenant notamment Raf, MEKK, MEK et MAPK. Cependant, on ne connaît pas encore les effecteurs situés en aval de cette voie de signalisation. Il est clair que chacun de ces composants constitue une cible thérapeutique potentielle pour le traitement des pathologies impliquant une prolifération cellulaire anormale. Ceci est d'autant plus vrai pour les composants situés en aval de la voie de signalisation, qui délivrent un message plus spécifique.

La présente invention résulte en partie de la mise en évidence que les protéines ETS constituent un médiateur de la transformation cellulaire induite par les protéines ras. Elle résulte également de la mise en évidence qu'il est possible de contrecarrer les effets transformants des protéines ras en utilisant des composés capables d'antagoniser l'activité des protéines ETS. La présente invention décrit également des systèmes particulièrement efficaces permettant la délivrance in vivo,

directement dans les tumeurs, de tels composés et ainsi de lutter contre le développement des cancers. La présente invention offre ainsi une nouvelle approche particulièrement efficace pour le traitement des tumeurs présentant un oncogène ras activé telles que les tumeurs du poumon non à petites cellules, les carcinomes pancréatiques et coliques, etc.

Un premier objet de l'invention réside donc dans l'utilisation d'un composé capable d'antagoniser l'activité des protéines ETS pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des cancers.

Plus particulièrement, les composés capables d'antagoniser l'activité des protéines ETS au sens de la présente invention sont des composés capables d'inhiber au moins partiellement la fixation à l'ADN des protéines ETS. De tels composés sont préférentiellement des oligonucléotides double-brin correspondant au site de fixation des protéines ETS sur l'ADN ou des dérivés des protéines ETS.

De manière tout particulièrement avantageuse, les composés utilisés dans le cadre de la présente invention sont des dérivés des protéines ETS, capables de se lier au site de fixation sur l'ADN, mais dépourvus de fonction transactivatrice.

Les protéines ETS forment une famille de facteurs de transcription, c'est-à-dire de protéines capables d'interagir avec l'ADN au niveau de sites de fixation spécifiques, et de stimuler la transcription de gènes. Les protéines ETS sont des protéines de 400 acides aminés environ, comportant plusieurs domaines fonctionnels : l'un, responsable de la fixation de la protéine sur l'ADN, d'autres, responsables de la transactivation. Cette organisation se rencontre dans les protéines ETS humaines, de rat, de poulet, etc.

Différents dérivés des protéines ETS peuvent être utilisés dans le cadre de la présente invention. Il peut s'agir en particulier de toute molécule obtenue à partir d'une protéine ETS par modification(s) de nature génétique et/ou chimique, conservant la capacité de se lier au site de fixation sur l'ADN, mais dépourvu d'activité transactivatrice. Par modification de nature génétique et/ou chimique, on entend toute mutation, délétion, substitution, addition, et/ou modification d'un ou plusieurs acides aminés. Comme indiqué ci-avant, les composés utilisés dans le cadre de la présente invention possèdent avantageusement une ou plusieurs modifications dans la région responsable de la transactivation. Avantageusement, ces modifications sont effectuées au niveau des résidus 1-160 pour PU.1, 1-374 pour c-Ets-1 et 1-363 pour c-Ets-2.

De telles modifications peuvent être effectuées par exemple par mutagenèse *in vitro*, par introduction d'éléments additionnels ou de séquences synthétiques, ou par des délétions ou des substitutions des éléments originels. Lorsqu'un dérivé tel que défini ci-dessus est réalisé, son activité d'inhibiteur partiel de la fixation des protéines ETS sur leur site de fixation sur l'ADN peut être mise en évidence de plusieurs façons, comme décrit dans les exemples. Toute technique connue de l'homme de l'art peut bien évidemment être utilisée à cet effet.

A titre d'exemples de dérivés des protéines ETS selon l'invention, on peut citer notamment les composés suivants :

- 10 - Δ PU.1, comprenant les résidus 160 à 266 de la protéine PU.1 de souris, correspondant au site de liaison à l'ADN;
- N70, comprenant les résidus 374 à 485 de la protéine c-Ets-1 de poulet, contenant le site de liaison à l'ADN;
- N70-DB, comprenant les résidus 374 à 472 de la protéine c-Ets-1 de poulet, 15 contenant le site de liaison à l'ADN;
- NM(2), comprenant le site de liaison à l'ADN de la protéine c-Ets-2 (résidus 364 à 479).

Les séquences nucléotidiques et peptidiques de ces composés sont accessibles sur banques de données (Databank notamment, numéro d'accès X07202 par exemple). Par ailleurs, de tels dérivés peuvent comporter des modifications supplémentaires au niveau notamment du site de liaison à l'ADN, permettant en particulier de réduire la taille de la séquence pour faciliter sa pénétration cellulaire, d'augmenter son activité d'inhibition, de cibler sa localisation cellulaire, ou également de construire des séquences adaptées à l'expression dans un type particulier de vecteur ou d'hôte.

25 Dans le cadre de la présente invention, ces composés dérivés des protéines ETS peuvent être utilisés tels quels ou, avantageusement, sous forme de constructions génétiques permettant leur expression *in vivo*.

Un mode de réalisation particulièrement avantageux de la présente invention consiste en effet à transférer dans les tumeurs une séquence nucléique codant pour un dérivé de protéine ETS tel que défini ci-dessus. Cette approche est particulièrement adaptée au traitement des cancers présentant un oncogène ras activé, tels que les carcinomes coliques ou bronchiques par exemple.

30 La séquence d'acides nucléiques utilisée dans le cadre de la présente invention peut être administrée telle quelle, sous forme d'ADN nu selon la technique décrite dans

la demande WO 90/11092. Elle peut également être administrés sous forme complexée, par exemple avec du DEAE-dextran (Pagano et al., J.Virol. 1 (1967) 891), avec des protéines nucléaires (Kaneda et al., Science 243 (1989) 375), avec des lipides (Felgner et al., PNAS 84 (1987) 7413), sous forme de liposomes (Fraley et al., J.Biol.Chem. 255 (1980) 10431), etc. Préférentiellement, la séquence utilisée dans le cadre de l'invention fait partie d'un vecteur. L'emploi d'un tel vecteur permet en effet d'améliorer l'administration de l'acide nucléique dans les cellules à traiter, et également d'augmenter sa stabilité dans lesdites cellules, ce qui permet d'obtenir un effet thérapeutique durable. De plus, il est possible d'introduire plusieurs séquences d'acide nucléique dans un même vecteur, ce qui augmente également l'efficacité du traitement.

Le vecteur utilisé peut être d'origine diverses, dès lors qu'il est capable de transformer les cellules animales, de préférence les cellules cancéreuses humaines. Dans un mode préféré de mise en oeuvre de l'invention, on utilise un vecteur viral, qui peut être choisi parmi les adénovirus, les rétrovirus, les virus adéno-associés (AAV) ou le virus de l'herpès.

A cet égard, la présente invention a également pour objet tout virus recombinant comprenant, inséré dans son génome, un acide nucléique codant pour un composé capable d'antagoniser la fixation sur l'ADN des protéines ETS. Plus particulièrement, elle concerne tout virus recombinant comprenant une séquence d'acides nucléique codant pour un dérivé des ETS capable de se lier à l'ADN mais dépourvu d'activité transactivatrice.

Préférentiellement, les virus utilisés dans le cadre de l'invention sont défectifs, c'est-à-dire qu'ils sont incapables de se répliquer de façon autonome dans la cellule infectée. Généralement, le génome des virus défectifs utilisés dans le cadre de la présente invention est donc dépourvu au moins des séquences nécessaires à la réplication dudit virus dans la cellule infectée. Ces régions peuvent être soit éliminées (en tout ou en partie), soit rendues non-fonctionnelles, soit substituées par d'autres séquences et notamment par la séquence codant pour l'inhibiteur des ETS. Préférentiellement, le virus défectif conserve néanmoins les séquences de son génome qui sont nécessaires à l'encapsidation des particules virales.

S'agissant plus particulièrement d'adénovirus, différents sérotypes, dont la structure et les propriétés varient quelque peu, ont été caractérisés. Parmi ces sérotypes, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus humains de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5) ou les adénovirus d'origine animale (voir

demande FR 93 05954). Parmi les adénovirus d'origine animale utilisables dans le cadre de la présente invention on peut citer les adénovirus d'origine canine, bovine, murine, (exemple : Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 81), ovine, porcine, aviaire ou encore simienne (exemple : SAV). De préférence, l'adénovirus d'origine animale est
5 un adénovirus canin, plus préférentiellement un adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple]. De préférence, on utilise dans le cadre de l'invention des adénovirus d'origine humaine ou canine ou mixte.

Préférentiellement, les adénovirus défectifs de l'invention comprennent les ITR, une séquence permettant l'encapsidation et la séquence codant pour le modulateur des
10 calpaines. Encore plus préférentiellement, dans le génome des adénovirus de l'invention, le gène E1 et au moins l'un des gènes E2, E4, L1-L5 sont non fonctionnels. Le gène viral considéré peut être rendu non fonctionnel par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par suppression totale, substitution, délétion
15 partielle, ou addition d'une ou plusieurs bases dans le ou les gènes considérés. De telles modifications peuvent être obtenues in vitro (sur de l'ADN isolé) ou in situ, par exemple, au moyens des techniques du génie génétique, ou encore par traitement au moyen d'agents mutagènes.

Les adénovirus recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés par toute technique connue de l'homme du métier (Levrero et al., Gene 101 (1991)
20 195, EP 185 573; Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917). En particulier, ils peuvent être préparés par recombinaison homologue entre un adénovirus et un plasmide portant entre autre la séquence d'ADN codant pour l'inhibiteur des ETS. La recombinaison homologue se produit après co-transfection desdits adénovirus et plasmide dans une lignée cellulaire appropriée. La lignée cellulaire utilisée doit de préférence (i) être
25 transformable par lesdits éléments, et (ii), comporter les séquences capables de compléter la partie du génome de l'adénovirus défectif, de préférence sous forme intégrée pour éviter les risques de recombinaison. A titre d'exemple de lignée, on peut mentionner la lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol.
30 36 (1977) 59) qui contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome d'un adénovirus Ad5 (12 %). Des stratégies de construction de vecteurs dérivés des adénovirus ont également été décrites dans les demandes n° FR 93 05954 et FR 93 08596.

Ensuite, les adénovirus qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire, comme illustré dans les exemples.

Concernant les virus adéno-associés (AAV), il s'agit de virus à ADN de taille relativement réduite, qui s'intègrent dans le génome des cellules qu'ils infectent, de manière stable et site-spécifique. Ils sont capables d'infecter un large spectre de cellules, sans induire d'effet sur la croissance, la morphologie ou la différenciation cellulaires. Par ailleurs, ils ne semblent pas impliqués dans des pathologies chez l'homme. Le génome des AAV a été cloné, séquencé et caractérisé. Il comprend environ 4700 bases, et contient à chaque extrémité une région répétée inversée (ITR) de 145 bases environ, servant d'origine de réplication pour le virus. Le reste du génome est divisé en 2 régions essentielles portant les fonctions d'encapsidation : la partie gauche du génome, qui contient le gène rep impliqué dans la réplication virale et l'expression des gènes viraux; la partie droite du génome, qui contient le gène cap codant pour les protéines de capsid du virus.

L'utilisation de vecteurs dérivés des AAV pour le transfert de gènes in vitro et in vivo a été décrite dans la littérature (voir notamment WO 91/18088; WO 93/09239; US 4,797,368, US5,139,941, EP 488 528). Ces demandes décrivent différentes constructions dérivées des AAV, dans lesquelles les gènes rep et/ou cap sont délétés et remplacés par un gène d'intérêt, et leur utilisation pour transférer in vitro (sur cellules en culture) ou in vivo (directement dans un organisme) ledit gène d'intérêt. Les AAV recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés par co-transfection, dans un lignée cellulaire infectée par un virus auxiliaire humain (par exemple un adénovirus), d'un plasmide contenant la séquence codant pour l'inhibiteur des ETS bordé de deux régions répétées inversées (ITR) d'AAV, et d'un plasmide portant les gènes d'encapsidation (gènes rep et cap) d'AAV. Les AAV recombinants produits sont ensuite purifiés par des techniques classiques.

Concernant les virus de l'herpès et les rétrovirus, la construction de vecteurs recombinants a été largement décrite dans la littérature : voir notamment Breakfield et al., New Biologist 3 (1991) 203; EP 453242, EP178220, Bernstein et al. Genet. Eng. 7 (1985) 235; McCormick, BioTechnology 3 (1985) 689, etc. En particulier, les rétrovirus sont des virus intégratifs, infectant sélectivement les cellules en division. Ils constituent donc des vecteurs d'intérêt pour des applications cancer. Le génome des rétrovirus comprend essentiellement deux LTR, une séquence d'encapsidation et trois régions codantes (gag, pol et env). Dans les vecteurs recombinants dérivés des rétrovirus, les gènes gag, pol et env sont généralement délétés, en tout ou en partie, et remplacés par une séquence d'acide nucléique hétérologue d'intérêt. Ces vecteurs peuvent être réalisés à partir de différents types de rétrovirus tels que notamment le

MoMuLV ("murine moloney leukemia virus"; encore désigné MoMLV), le MSV ("murine moloney sarcoma virus"), le HaSV ("harvey sarcoma virus"); le SNV ("spleen necrosis virus"); le RSV ("rous sarcoma virus") ou encore le virus de Friend.

Pour construire des rétrovirus recombinants comportant une séquence d'intérêt, un plasmide comportant notamment les LTR, la séquence d'encapsidation et ladite séquence d'intérêt est généralement construit, puis utilisé pour transfecter une lignée cellulaire dite d'encapsidation, capable d'apporter en trans les fonctions rétrovirales déficientes dans le plasmide. Généralement, les lignées d'encapsidation sont donc capables d'exprimer les gènes gag, pol et env. De telles lignées d'encapsidation ont été décrites dans l'art antérieur, et notamment la lignée PA317 (US4,861,719); la lignée PsiCRIP (WO90/02806) et la lignée GP+envAm-12 (WO89/07150). Par ailleurs, les rétrovirus recombinants peuvent comporter des modifications au niveau des LTR pour supprimer l'activité transcriptionnelle, ainsi que des séquences d'encapsidation étendues, comportant une partie du gène gag (Bender et al., J. Virol. 61 (1987) 1639). Les rétrovirus recombinants produits sont ensuite purifiés par des techniques classiques.

Pour la mise en oeuvre de la présente invention, il est tout particulièrement avantageux d'utiliser un adénovirus ou un rétrovirus recombinant défectif. Ces vecteurs possèdent en effet des propriétés particulièrement intéressantes pour le transfert de gènes dans les cellules tumorales.

Avantageusement, dans les vecteurs de l'invention, la séquence codant pour le dérivé des ETS est placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans les cellules tumorales. Préférentiellement, il s'agit de signaux d'expression hétérologues, c'est-à-dire de signaux différents de ceux naturellement responsables de l'expression de l'inhibiteur. Il peut s'agir en particulier de séquences responsables de l'expression d'autres protéines, ou de séquences synthétiques. Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter. De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus, y compris du virus utilisé. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs E1A, MLP, CMV, LTR-RSV, etc. En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, ou permettant une expression tissu-spécifique. Il peut en effet être particulièrement intéressant d'utiliser des signaux

d'expression actifs spécifiquement ou majoritairement dans les cellules tumorales, de manière à ce que la séquence d'ADN ne soit exprimée et ne produise son effet que lorsque le virus a effectivement infecté une cellule tumorale.

5 Dans un mode particulier de réalisation, l'invention concerne un virus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADNc codant pour un dérivé des ETS sous le contrôle d'un promoteur viral, choisi de préférence parmi le LTR-RSV et le promoteur CMV.

10 Toujours dans un mode préféré, l'invention concerne un virus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADN codant pour un dérivé des ETS sous le contrôle d'un promoteur permettant une expression majoritaire dans les cellules tumorales.

L'expression est considérée comme majoritaire au sens de l'invention lorsque, même si une expression résiduelle est observée dans d'autres types cellulaires, les niveaux d'expression sont supérieurs dans les cellules tumorales.

15 La présente invention concerne également toute composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs virus recombinants défectifs tels que décrits précédemment. Ces compositions pharmaceutiques peuvent être formulées en vue d'administrations par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc. De préférence, les
20 compositions pharmaceutiques de l'invention contiennent un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une injection directe dans la tumeur du patient. Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de
25 solutés injectables. L'injection directe dans la tumeur du patient est avantageuse car elle permet de concentrer l'effet thérapeutique au niveau des tissus affectés.

Les doses de virus recombinant défectif utilisées pour l'injection peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du vecteur
30 viral, du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée ou encore de la durée du traitement recherchée. D'une manière générale, les adénovirus recombinants selon l'invention sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une solution de virus, et est déterminé par
35 infection d'une culture cellulaire appropriée, et mesure, généralement après 48 heures,

du nombre de plages de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature. Concernant les rétrovirus, les compositions selon l'invention peuvent comporter directement les cellules productrices, en vue de leur implantation.

5 Les compositions pharmaceutiques selon l'invention peuvent être utilisées pour moduler l'activation des protéines p21 et de ce fait pour moduler la prolifération de certains types cellulaires. Plus particulièrement, ces compositions pharmaceutiques sont destinées au traitement de cancers présentant un oncogène ras activé. De nombreux cancers ont en effet été associés à la présence de protéines ras
10 oncogéniques. Parmi les cancers renfermant le plus souvent des gènes ras mutés, on peut citer notamment les adénocarcinomes du pancréas, dont 90% ont un oncogène Ki-ras muté sur le douzième codon (Almoguera et coll., Cell 53 (1988) 549), les adénocarcinomes du colon et les cancers de la thyroïde (50%), ou les carcinomes du poumon et les leucémies myéloïdes (30%, Bos, J.L. Cancer Res. 49 (1989) 4682).

15 L'invention a encore pour objet l'utilisation des molécules décrites ci-avant pour moduler l'activité des protéines p21. En particulier, l'invention concerne l'utilisation de ces molécules pour inhiber au moins partiellement l'activation des protéines p21.

20 D'autres avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Techniques générales de biologie moléculaire

25 Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans Escherichia coli, etc ... sont bien
30 connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor

Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Les plasmides de type pBR322, pUC et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories).

- 5 Pour les ligatures, les fragments d'ADN peuvent être séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

- 10 Le remplissage des extrémités 5' proéminentes peut être effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'E. coli (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

- 15 La mutagénèse dirigée in vitro par oligodéoxynucléotides synthétiques peut être effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. **13** (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

- 20 L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science **230** (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. **155** (1987) 335-350] peut être effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant. L'amplification d'ADN génomique est réalisée plus particulièrement dans les conditions suivantes : 5 minutes à 100°C, 30 cycles d'une minute à 95°C, 2 minutes à 58°C puis 3 minutes à 72°C au moyen de sondes
25 appropriées. Les produits d'amplification sont analysés par électrophorèse sur gel.

La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74** (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

Exemples

- 30 Exemple 1. Matériel et Méthodes

1.1. Constructions utilisées

- Le plasmide pBLCAT4(4B) comporte notamment le domaine α de l'enhancer du virus du polyome, le promoteur de la thymidine kinase et un gène

marqueur (le gène CAT). La construction de ce plasmide a été décrite dans Wasylyk et al., Genes Dev., 6, 965-974. Le plasmide pBLCAT4 correspond au plasmide pBLCAT4(4B), mais dépourvu du domaine α de l'enhancer du virus du polyome.

- Les constructions suivantes ont été décrites dans la littérature: N70, NM(2),
5 DELTA PU.1, [NN(P)], N69, N72 (Wasylyk et al., Genes Dev., 6, 965-974 et Cell Growth and Differ., 3, 617-625); N70-DELTAB(Wasylyk et al., Eur. J. Biochem., 211, 7-18 et Nucl. Acids Res., 1, 523-529); Gal4, Gal4-VP16, UAS-CAT (Webster et al., Cell, 52, 169-178); pSLJDELTA9Jun (Lloyd et al., Nature, 352, 635-638); pKJ-1 (Lohnes et al., Cell., 73, 381-393).

10 1.2. Cultures cellulaires

- Les cellules NIH3T3 transformées par Ras (lignée DT) et leurs cellules mères NIH3T3 non transformées (lignée C11) sont cultivées sur milieu Dubelco enrichi en antibiotiques et 10% de sérum de veau foetal. Sauf lorsque cela est spécifié, les transformations cellulaires ont été effectuées comme suit : 5 plaques de 90mm
15 contenant des cellules DT sont incubées pendant 20 heures en présence d'un précipité de phosphate de calcium contenant 5 μ g d'un vecteur d'expression d'un dérivé Ets, 0,5 μ g de pKJ-1 et 15 μ g de pEMBL18 par plaque. Les plaques sont ensuite lavées, de nouveau incubées 24 heures avec du milieu frais, puis avec un milieu contenant 1mg/ml de G418 (mélange de sulfate de généticine, GIBCO) jusqu'à apparition des clones. Les
20 clones sont sélectionnés par enrichissement par adhésion (Lloyd et al., voir ci-dessus), cultivés en culture en masse et congelés. Les lignées cellulaires sont ensuite propagées dans un milieu contenant 500 μ g/ml puis 300 μ g/ml de G418. Six lignées cellulaires dérivées des cellules DT, comportant un plasmide d'expression d'un dérivé de la protéine PU.1 ont ainsi été établies : Δ PU-R1(49PU), Δ PU-R2(4811), Δ PU-R3(4711),
25 Δ PU-R4(51), Δ PU-R5(4611) et Δ PU-R6(52).

Exemple 2 : Inhibition de la transformation induite par ras en utilisant des dérivés de délétion des protéines ETS

- 30 L'activité inhibitrice des dérivés de délétion des protéines ETS selon l'invention a été mise en évidence tout d'abord en utilisant la technique de transfection transitoire dans les fibroblastes LMTK⁻. Ces transfections contiennent un plasmide d'expression de ras et un plasmide reporteur, pBLCAT4(4B), comprenant notamment

le domaine α de l'enhancer du virus du polyome, le promoteur de la thymidine kinase et un gène marqueur (le gène CAT) (Cf exemple 1.1.). Dans ces cellules, l'expression de ras stimule la transcription par le domaine α de l'enhancer du virus du polyome. La co-expression dans ces cellules de dérivés des protéines ETS selon l'invention permet d'inhiber cette activation par ras.

Les cellules LMTK⁻ ont été transfectées en présence de phosphate de calcium par le plasmide reporteur, pBLCAT4(4B), ou un plasmide témoin dépourvu des éléments de réponse à ras (pBLCAT4); et différentes quantités (quantité totale : 20 μ g) :

- d'un vecteur d'expression de ras (pRCBx2)
- d'un vecteur d'expression d'une protéine dérivée de ETS selon l'invention, et
- de plasmide neutre pEMBL18.

Les cellules sont incubées 36 heures dans un milieu pauvre en sérum (0,05% SVF) et les extraits cellulaires sont ensuite analysés pour l'expression de l'activité CAT. Les activités CAT observées ont été normalisées par rapport à l'activité obtenue dans les cellules transformée par le plasmide pBLCAT4(4B) seulement, arbitrairement fixée à 100. Les résultats obtenus sont présentés dans la table 1. Ils représentent la moyenne de 2 à 10 expériences différentes de transfection.

Les résultats obtenus montrent que la séquence codant pour Δ PU.1 est capable d'inhiber spécifiquement à la fois l'activation du domaine α par ras et l'activité constitutive de ras. En revanche, cette séquence n'a aucun effet sur la transactivation par un facteur hétérologue constitué du site de liaison à l'ADN de GAL4 lié au domaine transactivateur de VP16 (GAL4-VP16). Ces résultats démontrent (i) une activité d'inhibition très élevée des séquences selon l'invention et (ii) que cette activité d'inhibition est spécifique du domaine α et n'est pas liée à un effet non-spécifique sur la viabilité ou la transcription cellulaires.

Les résultats obtenus montrent que la même activité d'inhibition sélective est observée en utilisant les dérivés des protéines ETS N70, N70- Δ B et NM(2). En revanche, l'utilisation d'un dérivé de ETS modifié au niveau du domaine de liaison à l'ADN (N69 comportant les résidus 382-485, et N72 comportant les résidus 383-485) n'a pas d'effet sur l'activation par ras, ce qui confirme bien le caractère spécifique de l'inhibition observée avec les dérivés selon l'invention.

Exemple 3 : Les dérivés de délétion des protéines ETS inhibent la formation de colonies en agar, la croissance en milieu pauvre en sérum, la densité de saturation et l'apoptose.

5 L'activité des constructions selon l'invention sur la voie de signalisation par ras a été confirmée par étude de leur effet sur la formation de colonies, la croissance en milieu pauvre en sérum, la densité de saturation et l'apoptose.

1. Formation de colonies

10 Pour cela, 10^4 cellules (cellules C11, DT, et lignées Δ PU établies) ont étéensemencées dans 0,75% d'agar dans des plaques multipuits Falcon, diamètre des puits : 3,5cm), selon la technique décrite par Wharton et Smith (In R.Baserga (ed), "Cell Growth and Division"; IRL Press, Oxford, 1989, p139). Le nombre de colonies formées et le nombre de cellules par colonie (taille des colonies) ont été déterminés 8 jours après. Chaque valeur donnée correspond à une moyenne de quatre expériences réalisées en double. Les résultats obtenus sont présentés sur la table 2.

15 Les résultats montrent que les cellules DT (transformées par ras) forment des colonies beaucoup plus importantes que les cellules C11 (non transformées par ras). Ce tableau montre également que les lignées Δ PU ne donnent que quelques colonies de petites tailles, ce qui montre bien que, dans ces lignées, l'activité transformante de ras est inhibée.

20 2. Croissance en milieu pauvre en sérum et densité de saturation

Par ailleurs, cette expérience a permis de montrer que les cellules C11 (non transformées par ras) sont plus sensibles que les cellules DT aux faibles concentrations en sérum : elles poussent plus lentement et leur croissance s'arrête à des densités de saturation bien inférieures en raison d'inhibitions de contact. Cette expérience a permis
25 de montrer que les cellules des lignées Δ PU poussaient également beaucoup plus lentement que les cellules DT, et atteignaient la saturation à des densités bien inférieures. Ces résultats confirment que les lignées Δ PU se comportent comme la lignée non transformée par ras, et sont donc capables de réverter les effets de ras.

3. Apoptose

30 L'effet de ras et des composés de l'invention sur la mort cellulaire par apoptose a été étudié en cultivant 10^5 cellules sur des plaques de 90mm dans les conditions décrites dans l'exemple 1.2. A différents temps, une plaque a été utilisée pour compter le nombre de cellules viables et 2 plaques pour isoler l'ADN cellulaire et analyser son profil selon la technique décrite par Debbas et al. (Genes & Dev. 7 (1993)
35 546). Il a ainsi été observé que les cellules C11 (non transformées par ras) arrêtent de

pousser à confluence mais restent viables, tant dis que les cellules DT meurent par apoptose. En particulier, une dégradation de l'ADN des cellules DT caractéristique de l'apoptose a pu être observée, détectable même avant la diminution du nombre de cellules. Cette expérience a également permis de montrer (i) que l'ADN des cellules C11 ne présente pas le profil de dégradation caractéristique de l'apoptose bien que, dans quelques cas, une certaine dégradation soit observée; (ii) que l'ADN des cellules Δ PU-R1 et Δ PU-R2 ne présente aucune dégradation du type observé dans l'apoptose et (iii) une certaine dégradation est observée pour les lignées Δ PU-R3-6, mais bien plus tard que pour les cellules DT.

Ces résultats confirment bien que les lignées Δ PU présentent les caractéristiques de la cellule C11 non transformée, tant du point de vue de la formation de colonies, de la croissance en milieu pauvre en sérum, de la densité de saturation que de l'apoptose, ce qui démontre bien que l'expression in vivo des dérivés ETS selon l'invention est capable de réverter le phénotype transformant induit par ras.

Exemple 4 : Les dérivés de délétion des protéines ETS inhibent la formation de tumeurs dans les souris "nude".

Cet exemple démontre l'activité inhibitrice des protéines ETS selon l'invention sur la formation de tumeurs in vivo. Pour cela, 10^6 cellules (cellules C11, DT, et lignées Δ PU établies) fraîchement décongelées ont été cultivées en milieu Dulbecco supplémenté de 10% SVF, trypsinisées puis utilisées pour l'injection. Les cellules ont ainsi été injectées ($10^6/100\mu\text{l}$ PBS) sous la peau, de chaque côté du dos de 2 souris "nude". Le diamètre des tumeurs formées a ensuite été mesuré à l'aide de calipers aux jours 3, 6 et 8. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 3. Chaque valeur représente la moyenne obtenue pour chaque souris.

Les résultats obtenus montrent que les cellules DT (transformées par ras) forment des tumeurs dans les souris nude qui sont clairement détectables 3 jours après l'injection. Au contraire, les cellules non transformées (C11) n'induisent aucune tumeur détectable. Ces résultats montrent aussi que les lignées Δ PU ont, par rapport aux cellules DT, un effet tumorigène nettement diminué, voire supprimé. Ainsi, les lignées Δ PU-R1, Δ PU-R2 et Δ PU-R6 n'entraînent la formation d'aucune tumeur (au jour 3). Par ailleurs, les lignées Δ PU-R3, Δ PU-R4 et Δ PU-R5 induisent l'apparition plus lente de tumeurs de plus petite taille, indiquant que dans ces cellules également, l'activité transformante de ras a été inhibée au moins en partie.

Ces résultats montrent donc clairement que les composés selon l'invention présentent in vivo des propriétés antitumorales importantes.

Exemple 5 : Effets inhibiteurs de dérivés de délétion des protéines c-ETS-1 et c-ETS-

5 2.

Cet exemple montre que l'activité mise en évidence dans le cadre de la présente invention n'est pas limitée aux dérivés de PU, mais existe aussi pour des dérivés d'autre protéines de la famille des ETS.

10 Six clones indépendants correspondant à chaque dérivé d'ETS suivants ont été établis selon le protocole décrit dans l'exemple 1.2. : Δ PU, N70, N70- Δ et NM(2). Ces clones ont ensuite été cultivés en culture de masse, sélectionnés, et analysés pour différents critères de réversion du phénotype ras transformé comme décrit dans les exemples 2 à 4 : ADN intégré, activité de liaison de l'ADN, niveaux de protéine ras, formation de colonies en soft agar, croissance en milieu pauvre en sérum, niveaux
15 d'ARN de la cathepsine L. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 4. Les valeurs données sont la moyenne des expériences réalisées. Les résultats présentés dans le tableau 4 montrent que les différentes lignées cellulaires contiennent de l'ADN intégré et expriment une protéine capable de lier les motifs ETS. Ces lignées ne forment que peu de colonies en soft agar, présentent un temps de doublement réduit en
20 milieu pauvre en sérum, s'arrêtent de pousser à une densité de saturation faible, et ont des niveaux de cathepsine intacts. Ces résultats confirment clairement que le phénotype ras peut être réversé selon l'invention par des dérivés d'ETS de différentes origines.

Exemple 6 : Construction d'un adénovirus recombinant exprimant un dérivé de délétion des protéines ETS.

25 Cet exemple décrit la construction d'un adénovirus recombinant comportant une séquence d'acides nucléiques codant pour un dérivé des protéines ETS selon l'invention. Cet adénovirus est construit par recombinaison homologue entre l'adénovirus défectif Ad-dl1324 et un plasmide portant la séquence codant pour ledit dérivé plasmide p Δ PU.1.

30 4.1. Construction du plasmide p Δ PU.1

Le plasmide p Δ PU.1 comporte la séquence codant pour le dérivé de délétion de la protéine PU.1 sous le contrôle du promoteur LTR-RSV, ainsi que des régions de l'adénovirus permettant la recombinaison homologue. Il est construit par insertion

de la séquence codant pour Δ PU.1 dans le plasmide pAd.RSV β gal. Le plasmide pAd.RSV β Gal contient, dans l'orientation 5'->3',

- le fragment PvuII correspondant à l'extrémité gauche de l'adénovirus Ad5 comprenant : la séquence ITR, l'origine de réplication, les signaux d'encapsidation et l'amplificateur E1A;
- le gène codant pour la β -galactosidase sous le contrôle du promoteur RSV (du virus du sarcome de Rous),
- un second fragment du génome de l'adénovirus Ad5, qui permet la recombinaison homologue entre le plasmide pAd.RSV β Gal et l'adénovirus d1324. Le plasmide pAd.RSV β Gal a été décrit par Stratford-Perricaudet et al. (J. Clin. Invest. 90 (1992) 626).

4.2. Construction de l'adénovirus recombinant

- Le vecteur décrit en 4.1. est linéarisé et cotransfecté avec un vecteur adénoviral déficient, dans les cellules helper (lignée 293) apportant en *trans* les fonctions codées par les régions E1 (E1A et E1B) d'adénovirus.

- Plus précisément, l'adénovirus recombinant est obtenu par recombinaison homologue *in vivo* entre l'adénovirus mutant Ad-d1324 (Thimmappaya et al., Cell 31 (1982) 543) et le vecteur décrit dans l'exemple 4.1., selon le protocole suivant : le plasmide p Δ PU.1 et l'adénovirus Ad-d1324, linéarisé par l'enzyme ClaI, sont cotransfectés dans la lignée 293 en présence de phosphate de calcium, pour permettre la recombinaison homologue. Les adénovirus recombinants ainsi générés sont ensuite sélectionnés par purification sur plaque. Après isolement, l'ADN de l'adénovirus recombinant est amplifié dans la lignée cellulaire 293, ce qui conduit à un surnageant de culture contenant l'adénovirus déficient recombinant non purifié ayant un titre d'environ 10^{10} pfu/ml.

- Les particules virales sont purifiées par centrifugation sur gradient de chlorure de césium selon les techniques connues (voir notamment Graham et al., Virology 52 (1973) 456). L'adénovirus obtenu peut être conservé à -80°C dans 20 % de glycérol.

Exemple 7 : Construction d'un rétrovirus recombinant exprimant un dérivé de délétion des protéines ETS.

Cet exemple décrit la construction d'un rétrovirus recombinant comportant une séquence d'acides nucléiques codant pour un dérivé des protéines ETS selon

l'invention. Ce rétrovirus comporte en outre une séquence de blocage de la transcription permettant de prévenir la toxicité éventuelle du dérivé de délétion ETS sur la croissance de la lignée d'encapsulation utilisée.

- 5 Le rétrovirus recombinant est construit à partir du plasmide pnlslacZ^{RT} décrit par Tchénio et al (J. Virol. 66 (1992) 1571) par substitution du gène nlsLacZ par la séquence codant pour le dérivé de délétion de la protéine PU.1. Le plasmide ainsi obtenu comprend essentiellement les éléments suivants :
- 10 - Les LTR du rétrovirus MoMLV;
- La séquence d'encapsulation incluant une partie du gène gag du rétrovirus MoMLV; et,
- Une cassette d'expression du dérivé de PU.1 comportant la séquence codante sous le contrôle du promoteur du gène de la thymidine kinase du virus HSV séparés par une séquence de blocage de la transcription (site de polyadénylation du
- 15 virus SV40) flanquée d'un site accepteur et d'un site donneur d'épissage.

- Ce plasmide est ensuite utilisé pour générer les rétrovirus recombinants correspondants par transfection, en présence de phosphate de calcium, dans les cellules d'encapsulation GP+envAm-12. Les rétrovirus recombinants ainsi produits sont ensuite isolés du milieu de culture, purifiés puis conservés en vue de leur
- 20 utilisation. Il est également possible d'utiliser directement les lignées d'encapsulation transfectées (lignées productrices) sous forme d'implants.

EXPRESSION VECTOR	REPORTER											
	pBLCAT4(x4B)						UAS.CAT					
	0	10	0	2.5	5.0	10	0	2.5	5.0	10	0	2
Ha RAS	100	20	600	175	60	20	300	300	300	300	2	
GAL	100	50	600	175	230	200	300	300	300	300	2	
GAL-VP16	100	125	600	470	500	450						
ΔPU.1/N70/NM(2)/N70-ΔB/Δ9	100	50	600	175	230	200	300	300	300	300	2	
ΔPU.1 (PU.1)	100	20	600	175	60	20	300	300	300	300	2	
N70 (c-Eis-1)	100	50	600	175	230	200	300	300	300	300	2	
NM(2) (c-Eis-2)	100	125	600	470	500	450						
N70-ΔB (c-Eis-1)	100	50	600	350	-	450						

Tableau 1

5

10

15

20

25

30

SOFT AGAR			
CELL LINES		NUMBER OF COLONIES	COLONY SIZE
CONTROLS	DT	450 - 550	600 - 1000
	DT-neo	500 - 600	600 - 1000
	C11	4 - 10	50 - 150
Δ PU.1	Δ PU-R1	2 - 4	50 - 150
	Δ PU-R2	100 - 150	50 - 300
	Δ PU-R3	5 - 12	100 - 200
	Δ PU-R4	10 - 20	50 - 200
	Δ PU-R5	50 - 60	100 - 200
	Δ PU-R6	60 - 75	50 - 200

35

Tableau 2

5

10

15

20

25

30

35

		TUMOUR SIZE (mm)			
		3	6	8	
CELL LINES	DAYS				
		4-6	4-7	7-10	
CONTROLS	DT	4-6	4-6	6-8	
	DT-neo	4-6	4-6	6-8	
	C11	0-0	0-0	0-0	
Δ PU.1	Δ PU-R1	0-0	0-0	0-0	
	Δ PU-R2	0-0	0-2	2-4	
	Δ PU-R3	1-3	3-5	3-6	
	Δ PU-R4	0-3	4-6	6-8	
	Δ PU-R5	1-3	3-5	3-6	
	Δ PU-R6	0-0	2-4	2-4	

Tableau 3

Tableau 4

CELL TYPES	EXPRESSION OF TRANS-DOMINANT		COLONY FORMATION SOFT AGAR		GROWTH LOW SERUM		GENE EXPRESSION
	INTEGRATED DNA	DNA BINDING ACTIVITY	NUMBER OF COLONIES	SIZE (CELLS)	SAT. DENSITY (x10 ⁻⁶)	DOUBLING TIME (h)	
DT-n80	0	0	400 - 600	600 - 1000	3 - 4	6	+++ +
C11	0	0	4 - 10	50 - 150	0.2 - 0.5	25	+
ΔPU (PU.1)	+	+	4 - 80	50 - 200	0.6 - 2	8 - 14	+++ +
N70 (Ets-1)	+	+	50 - 200	300 - 800	0.5 - 2	8 - 15	+++ +
N70 - ΔB (Ets-1)	+	NI	1 - 50	50 - 100	NI	NI	NI
NM(2) (Ets-2)	+	+	10 - 50	50 - 200	0.6 - 2	9 - 12	+++ +

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'un composé capable d'antagoniser l'activité des protéines ETS pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des cancers.
- 5 2. Utilisation selon la revendication 1 d'un composé capable d'inhiber au moins partiellement la fixation à l'ADN des protéines ETS.
3. Utilisation selon la revendication 2 caractérisée en ce que le composé est un dérivé des protéines ETS.
- 10 4. Utilisation selon la revendication 2 ou 3 caractérisée en ce que le composé est un dérivé des protéines ETS capable de se lier au site de fixation sur l'ADN, mais dépourvu de fonction transactivatrice.
5. Utilisation selon la revendication 3 ou 4 caractérisée en ce que le composé dérive des protéines ETS par mutation et/ou délétion.
- 15 6. Utilisation selon la revendication 5 caractérisée en ce que le composé dérive des protéines ETS par mutation et/ou délétion dans la région transactivatrice.
7. Utilisation selon l'une des revendications 3 à 6 caractérisée en ce que le composé est choisi parmi Δ PU.1, N70, N70-DB, et NM(2).
8. Utilisation d'une séquence nucléique codant pour un dérivé des protéines ETS capable d'antagoniser l'activité des protéines ETS pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des cancers.
- 20 9. Utilisation selon la revendication 8 caractérisée en ce que l'acide nucléique est utilisé sous forme complexée avec du DEAE-dextran, avec des protéines nucléaires, ou avec des lipides ou polymères cationiques, sous forme de liposomes ou encore tel quel.
- 25 10. Utilisation selon la revendication 8 ou 9 caractérisée en ce que l'acide nucléique fait partie d'un vecteur.

11. Utilisation selon la revendication 10 caractérisée en ce que l'acide nucléique fait partie d'un vecteur viral, choisi parmi les adénovirus, les rétrovirus et les virus adéno-associés.

5 12. Vecteur viral comprenant une séquence d'acide nucléique codant pour un composé capable d'inhiber au moins partiellement la fixation sur l'ADN des protéines ETS.

13. Vecteur viral selon la revendication 12 caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les adénovirus, les rétrovirus et les virus adéno-associés.

10 14. Vecteur viral selon l'une des revendications 12 ou 13 caractérisé en ce qu'il comprend une séquence codant pour un dérivé des protéines ETS capable de se lier au site de fixation sur l'ADN, mais dépourvu de fonction transactivatrice.

15 15. Virus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADNc codant pour un dérivé des protéines ETS capable de se lier au site de fixation sur l'ADN, mais dépourvu de fonction transactivatrice, sous le contrôle d'un promoteur viral.

20 16. Virus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADNc codant pour un dérivé des protéines ETS capable de se lier au site de fixation sur l'ADN, mais dépourvu de fonction transactivatrice, sous le contrôle d'un promoteur permettant une expression majoritaire dans les cellules tumorales.

17. Virus recombinant défectif selon les revendications 15 ou 16 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un adénovirus ou d'un rétrovirus.

25 18. Composition pharmaceutique comprenant une séquence d'acides nucléiques codant pour un dérivé des protéines ETS capable de se lier au site de fixation sur l'ADN, mais dépourvu de fonction transactivatrice.

19. Composition pharmaceutique selon la revendication 18 caractérisée en ce qu'elle comprend un vecteur viral selon l'une des revendications 12 à 17.

30 20. Composition selon la revendication 17 formulée en vue d'une administration intra-tumorale.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 95/01227

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/86 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C07K C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 91, no. 17, 16 August 1994 WASHINGTON US, pages 7932-7936, MARIA TERESA VOSO ET AL. 'Inhibition of hematopoiesis by competitive binding of transcription factor PU.1' see abstract see page 7933, left column, paragraph 3 see page 7934, right column, paragraph 2 - page 7935, right column, paragraph 1 see page 7936, left column, paragraph 2 - page 7936, left column, last paragraph</p> <p style="text-align: center;">--- -/-</p>	1-3, 5, 8, 9

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

A document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 November 1995

Date of mailing of the international search report

14.12.95

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Montero Lopez, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 95/01227

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 12, no. 12, December 1992 WASHINGTON US, pages 5355-5362, STEPHEN J. LANGER ET AL. 'Mitogenic signaling by colony stimulating-factor 1 and ras is suppressed by the ets-2 DNA-binding domain and restored by myc overexpression' see abstract see page 5356, left column, paragraph 1 see page 5356, left column, last paragraph - right column, paragraph 1 see page 5357, left column, paragraph 1 -----</p>	1-10

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den Internationale No
PCT/FR 95/01227

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N15/86 A61K48/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 C07K C12N A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie * Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents

no. des revendications visées

X

PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF
SCIENCES OF USA,
vol. 91, no. 17, 16 Août 1994 WASHINGTON
US,
pages 7932-7936,
MARIA TERESA VOSO ET AL. 'Inhibition of
hematopoiesis by competitive binding of
transcription factor PU.1'
voir abrégé
voir page 7933, colonne de gauche, alinéa
3
voir page 7934, colonne de droite, alinéa
2 - page 7935, colonne de droite, alinéa 1
voir page 7936, colonne de gauche, alinéa
2 - page 7936, colonne de gauche, dernier
alinéa

1-3,5,8,
9

-/--

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- * "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- * "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- * "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- * "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- * "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- * "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- * "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- * "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- * "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

2

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

24 Novembre 1995

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

14.12.95

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Montero Lopez, B

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE :

Derr Internationale No
PCT/FR 95/01227

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 12, no. 12, Décembre 1992 WASHINGTON US, pages 5355-5362, STEPHEN J. LANGER ET AL. 'Mitogenic signaling by colony stimulating-factor 1 and ras is supressed by the ets-2 DNA-binding domain and restored by myc overexpression' voir abrégé voir page 5356, colonne de gauche, alinéa 1 voir page 5356, colonne de gauche, dernier alinéa - colonne de droite, alinéa 1 voir page 5357, colonne de gauche, alinéa 1</p> <p>-----</p>	1-10

THIS PAGE, BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)